第2卷第4期增刊 动物学研究 Vol.2, No.4
1981年11月 ZOOLOGICAL RESEARCH Nov., 1981

眼镜蛇 (*Naja naja atra*) 神经毒素抗体和心脏毒素抗体的亲和层析纯化

孙 欣 龚潮梁 何其伟 潘淑英
（中国科学院昆明动物研究所）

摘 要

用纯化的眼镜蛇神经毒素和心脏毒素分别免疫家兔，得到兔抗神经毒素血清和抗心脏毒素血清。神经毒素和心脏毒素通过其游离氨基固相化在Sepharose 4B上，不改变它们的抗原性。用溴化氰活化的Sepharose 4B分别偶联神经毒素和心脏毒素作为亲和吸附剂，从兔抗神经毒素血清、兔抗心脏毒素血清和马抗眼镜蛇毒血清中分别提纯了神经毒素抗体和心脏毒素抗体。这些抗体对眼镜蛇毒进行免疫扩散时都只呈现单一的沉淀线，它们的亲和洗脱都十分类似，提纯的神经毒素抗体和心脏毒素抗体的中和效价比其兔抗毒血清分别提高17.5倍和35倍、比精制马抗眼镜蛇毒血清分别提高50倍和33.3倍。本文还讨论了如何提高抗眼镜蛇毒血清的效价和研制高效抗毒血清途径等问题，这些结果对蛇伤治疗可能是有好处的。

眼镜蛇神经毒素和心脏毒素已被分离、纯化，它们是眼镜蛇毒中的两个主要成分，分别占其干粉的7%和40%左右。

国内生产的抗眼镜蛇毒血清已用于治疗眼镜蛇毒咬伤，但效价还不高，血清用量大。Yang等人[1]将神经毒固相化在溴化氰活化的Sepharose 4B上，应用亲和层析，从兔抗神经毒血清中纯化得到了神经毒抗体，并且发现除存在沉淀性抗体外，还存在非沉淀性抗体，这两种抗体及其木瓜蛋白酶水解产物的特异性中和效价比抗神经毒血清分别提高18.1，23.0；17.4和27.6倍，纯化的神经毒抗体提高27.0倍。但眼镜蛇毒中除神经毒素外，还含有另一个主要毒性成分—心脏毒素，注射眼镜蛇毒的动物用人工呼吸维持生命时，它们最终仍会因心脏毒素引起的循环衰竭而死亡，因此如能制备心脏毒素抗体，配以一定的神经毒素抗体，可望提高改善眼镜蛇咬伤的治疗。本文报导的用纯化的神经毒素和心脏毒素分别免疫家兔，然后用亲和层析技术，分别获得了神经毒素抗体和心脏毒素抗体，还讨论了如何提高抗眼镜蛇毒血清效价和研制高效抗毒血清问题。

材料和方法

一、材料　眼镜蛇毒取自广西，冷冻干燥制品，小白鼠LD_{50}为8.7微克/20克(ip)。

溴化氰活化的Sepharose 4B，Sephadex G10，Sephadex G50和SE-Sephadex C25为瑞典pharmacia产品，羧甲基纤维素CM32为英国Whatman产品，划痕卡介苗为北京生物制品所产品，精制抗眼镜蛇毒血清为上海生物制品所产品，系用脱毒的眼镜蛇毒免疫马匹，经用硫酸铵沉淀和胃蛋白酶消化精制的血清，效价为每毫升3毫克。

眼镜蛇神经毒素和心脏毒素的分离和纯化，按龚湖梁等的方法[2]分离纯化神经毒素。羧甲基纤维素CM32柱层析，0.25M NaCl洗脱获得G_1和G_2两个组份，分别合并G_1和G_2，冷冻干燥，Sephadex G10脱盐，再进行SE-Sephadex C25重层析（1.5×30 cm），用0.05M磷酸缓冲液平衡（含0.2M NaCl pH6.0），氯化钠线性梯度为0～0.4M，每小时分部收集12～14毫升，合并相应组份，冷冻干燥、脱盐，最后用Sephadex G50凝胶过滤（2.0×120cm）平衡洗脱液为0.05M磷酸缓冲液（pH7.4），流速为每小时12毫升。冷冻干燥、脱盐，经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定，均为单一区带（T＝15%，C＝2.6% pH4.3）。LD_{50}按Karber法进行测定。

二、抗血清制备　按Yang等人[1]方法，分别采用Freund's完全佐剂、递增毒量隔周交替于2.5～3.5公斤家兔背部皮下注射，神经毒素为6μg～1.9mg 1kg体重，心脏毒素为20μg～4.8mg 1kg体重，为期3个月，于最后一次注射后的7～10天放血，所得血清即为抗毒血清。

三、神经毒素抗体和心脏毒素抗体的亲和层析纯化　按Yang等人[1]方法制成Sepharose 4B-神经毒素和Sepharose-4B-心脏毒素亲和吸附剂，每毫升亲和吸附剂偶联2毫克纯化毒素，混和物小心搅拌1小时（室温），4°C存放过夜、完全偶联后，用偶联缓冲液（0.1M $NaHCO_3$＋0.5M NaCl，pH8.5）洗去非共价结合蛋白，测定洗下液的蛋白量，计算出偶联率为90%左右。凝胶的残余活性基团用1M乙醇胺（pH8.0），4°C下封闭，过量的乙醇胺用偶联缓冲液、0.1M醋酸钠缓冲液(含0.5M NaCl，pH4.0）和偶联缓冲液依次洗去。

偶联好的亲和吸附剂装入亲和柱中（1.5×16cm），用偶联缓冲液平衡，按平衡透析过的抗毒血清流经亲和柱两至三次（有时也可在烧杯内充分搅拌），使之完全吸附。顺次用偶联缓冲液（pH8.5），0.01M醋酸钠缓冲液-0.5M NaCl（pH5.5），0.1M醋酸钠缓冲液-0.5M NaCl（pH4.0），0.1M醋酸钠缓冲液-0.5M NaCl（pH3.5）和0.53M甲酸-0.15M NaCl（pH2.05）洗脱。收集甲酸洗脱液，即刻用1.0M甘氨酸-NaOH缓冲液（pH11.5）中和至pH7.0，对0.01M Tris-HCl-0.15M NaCl缓冲液（pH7.5）充分透析（4°C），离心除去不溶物，紫外测定蛋白浓度，$E_{1cm}^{1\%}=14$计算之。

四、血清及抗体的特异性中和效价测定　采用两倍稀释血清或纯化抗体，与30 LD_{50}神经毒素或心脏毒素等体积混合，于37°C保温1小时后，置4°C 4小时，离心除

去沉淀，每只小白鼠腹腔注射0.2毫升/20克体重，每组为六只动物。观察24小时内动物存活和死亡情况，以最小量血清或抗体保护动物全部存活为标准，计算血清或抗体的特异中和效价，用每毫克中和LD_{50}数表示之。

五、免疫扩散　采用1%琼脂板进行，中央孔置抗毒血清或抗体，周围孔置毒素，4°C扩散24小时～36小时，偶氮胭脂红或亮绿染色。

实验结果

1.眼镜蛇毒神经毒素和心脏毒素的纯化：

羧甲基纤维素CM32柱层析0.07*M*和0.25*M* NaCl阶段洗脱分别获得E和G_1、G_2组份[2]根据小白鼠毒性试验和大白鼠膈神经膈肌标本实验表明，组份E为神经毒素，按龚等方法[2]进一步纯化，聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫扩散均显示一条带（见图1）用作神经毒免疫抗原和偶联配基，小鼠腹腔注射LD50为1.1μg/20克。

组份G_1和G_2均能造成离体小鸡颈二腹肌和大白鼠膈肌挛缩（contraction），随后麻痹，且能造成离体蛙心收缩停止，与Lee等[3]的眼镜蛇毒心脏毒素生物学性质一致，由此我们判定它们都是心脏毒素。分别进行SE-Sephadex C25重层析，随后对它们的主峰再进行葡聚糖凝胶G_{50}纯化，纯化的心脏毒素G_1和G_2的聚丙烯酰胺凝胶电泳均呈现一条带（图2A），马抗眼镜蛇毒血清的琼脂糖扩散和免疫电泳均显示一条沉淀线，G_1和G_2与抗体形成的沉淀线完全融合（图2B），表明它们具有共同抗原，本文将G_1作为心脏毒素抗原免疫家兔和偶联配基（小鼠腹腔注射LD_{50}为29.6μg/20克体重）。

二、免疫结果

眼镜蛇神经毒素免疫家兔，当注射剂量由每公斤体重25和80微克分别增至50和120微克时，个别动物会在注后5—12小时内死亡，尸检见肝破裂等。宜加注意。最后一次注射前心脏抽血检查，抗体效价为每毫升中和240LD_{50}时，即行放血。眼镜蛇心脏毒素免疫家兔，剂量由每公斤体重20μg递增至4.8mg，未发生死亡，但动物于注射部位产生严重红肿和溃烂，放血前试血表明，每毫升抗血清中和效价最高达10LD_{50}，而精制马抗眼镜蛇毒血清每毫升可中和240LD_{50}神经毒和30LD_{50}心脏毒素，为了便于比较，按Lowary等人[4]方法测定血清蛋白浓度，结果为，一毫升精制抗眼镜蛇毒血清含蛋白200mg，一毫升抗神经毒素血清和一毫升抗心脏毒素血清含蛋白70mg。

三、纯化抗体的分离

每毫升溴化氰活化的Sepharose 4B偶联配基-神经毒素或心脏毒素2mg，含0.5*M* NaCl的0.1*M*碳酸氢钠缓冲液，偶联缓冲液pH8.5，偶联率可达90%。

心脏毒素和神经毒素抗体一样，用几个不同pH缓冲液进行阶段洗脱，获得几个吸附力不同的抗体，如图所见（图3）用含0.5*M* NaCl的pH5.5，4.0和3.5的醋酸缓冲液至少可洗下三个以上的抗体成分，显然它们与各自抗原的亲和力是不同的，我们将含

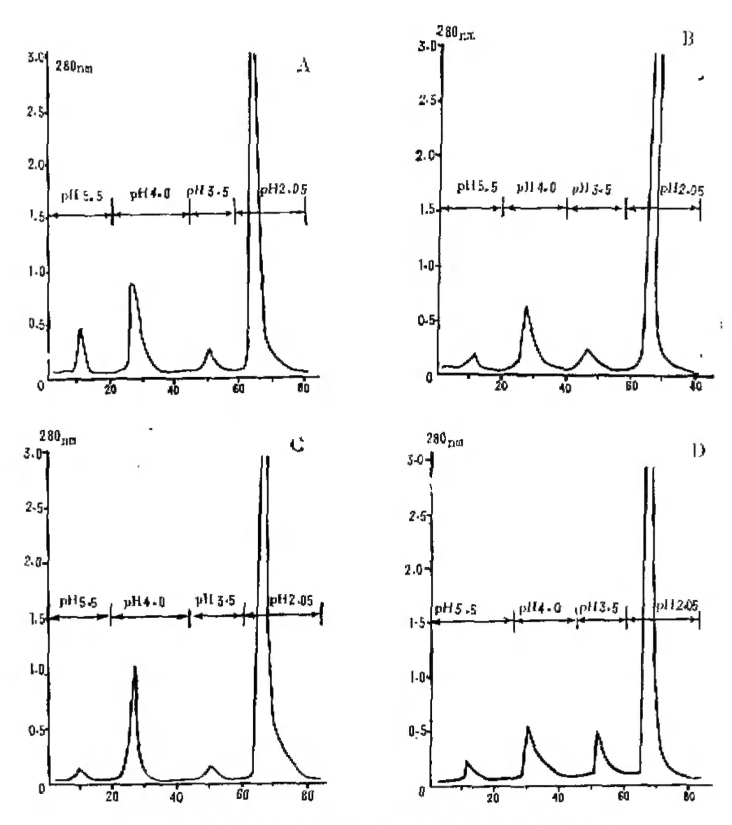


图 3　神经毒素抗体和心脏毒素抗体的亲和层析图

A：眼镜蛇神经毒素-Sepharose亲和柱（1.5×16cm）。眼镜蛇神经毒素抗血清25ml

B：眼镜蛇心脏毒素G_1-Sepharose亲和柱（1.5×16cm）。眼镜蛇心脏毒素抗血清20ml

C：眼镜蛇神经毒素-Sepharose亲和柱（1.5×16cm）

D：眼镜蛇心脏毒素-Sepharose亲和柱（1.5×16cm）。15ml精制马抗眼镜蛇毒血清流经D亲和柱后，再流经C柱

0.15M NaCl pH2.05的0.53M甲酸溶液洗下的部分命名为纯化抗体，一毫升精制抗眼镜蛇毒血清可分离到5.3mg心脏毒素抗体和3.0mg 神经毒素抗体；一毫升兔抗心脏毒素血清分离到1.0mg心脏毒素抗体；一毫升兔抗神经毒素血清分离到3.9mg神经毒抗体。提纯的神经毒素抗体和心脏毒素抗体对眼镜蛇毒进行免疫扩散都出现一条沉淀线（见图4 A 4 B）。

四、特异性中和效价

从表1可以看到，用精制马抗眼镜蛇毒血清分别与纯化神经毒素和心脏毒素保温，1毫升精制血清（含200mg蛋白）中和240LD_{50}的神经毒素（264μg）和30LD_{50}心脏毒

素（900μg），即按每毫克蛋白计算，1毫克精制血清可中和$1.2LD_{50}$神经毒素和0.15 LD_{50}心脏毒素。纯毒免疫的抗血清，每毫升含蛋白量70mg，1毫升抗神经毒素血清可中和$240LD_{50}$神经毒素，即每毫克中和$3.4LD_{50}$神经毒素，1毫升抗心脏毒素血清可中和$10LD_{50}$心脏毒素，即每毫克中和$0.14LD_{50}$心脏毒素，如以精制马抗眼镜蛇毒血清为1.0，纯化神经毒抗体和心脏毒抗体的相对效价即分别为50和33.3，如以纯毒素免疫血清为1.0，纯化神经毒素抗体和心脏毒素抗体的相对效价则为17.5和35，即纯化的神经毒素抗体和心脏毒素抗体的特异性中和效价比精制马抗眼镜蛇毒血清分别提高50倍和33.3倍，比纯毒免疫血清分别提高17.5倍和35倍。

表1　　　　抗血清或纯化抗体的特异性中和效价比较

抗血清或纯化抗体	特异性中和效价（LD_{50}/mg）		相对效价	
	神经毒素	心脏毒素	神经毒素	心脏毒素
精制马抗眼镜蛇毒血清	1.2	0.15	1.0	
兔抗神经毒素血清	3.4			1.0
纯化神经毒素抗体	60		50	17.5
兔抗心脏毒素血清		0.14		1.0
纯化心脏毒素抗体		5	33.3	35

讨　论

实验结果表明，每毫升精制抗眼镜蛇毒血清含有的神经毒素抗体应为4毫克，能中和3.77毫克眼镜蛇毒中的神经毒素264微克，同时每毫升血清含心脏毒素抗体应为6mg，能中和2.25毫克眼镜蛇毒中所含的心脏毒素900微克，由此可见，精制抗眼镜蛇毒血清中的心脏毒素抗体含量如能提高到每毫升10毫克，则可充分发挥该血清的作用，大大提高中和效价。

不论是用纯毒还是用全毒免疫动物，所得心脏毒素的相对含量和效价均不及神经毒素抗体。我们用心脏毒素免疫家兔所得抗体很少，每毫升血清仅1毫克。我们认为主要原因在于心脏毒素引起严重的组织溃烂，影响了抗原对免疫系统的刺激，而使抗体形成减少。至于神经毒素和心脏毒素的抗原性如何就更不清楚了。但用纯化心脏毒素经用化学修饰脱毒后再免疫动物以提高抗毒血清中的心脏毒素抗体还是可能的。

按本文所用的亲和层析法，从精制马抗眼镜蛇毒血清中提取神经毒素抗体和心脏毒素抗体、其效价比抗毒血清分别提高50倍和33.3倍。用纯化毒素制得的神经毒素抗体和心脏毒素抗体分别比它们的抗血清提高17.5倍和35倍，因此，用这两种抗体配成的抗毒素治疗眼镜蛇咬伤用量可大大减低。如果中和100毫克眼镜蛇毒中的神经毒素和心脏毒素，估计只需用106mg神经毒素抗体和267mg心脏毒素抗体，而用精制马抗眼镜蛇毒血清则需要33毫升（按每毫升血清中和3mg蛇毒计算），其蛋白含量为6600mg。如果眼镜蛇毒中主要致死成分确为神经毒素和心脏毒素，那么用神经毒素抗体和心脏毒抗体配制的抗毒素，

就可以大大减少蛋白用量。实验结果初步表明，如果以1mg神经毒抗体加2.72mg心脏毒抗体的比例配制，能中和0.522毫克眼镜蛇毒（LD_{50}=8.7μg/20克），似乎跟上述推想有差异，原因可能是蛇毒中毒是一个复杂的过程，蛇毒中成份很多，除各个毒性成分表现各自中毒特点外，它们还有协同作用。如磷酯酶A，它毒性虽然很小，但它与心脏毒素的协同作用以及本身的间接溶血作用是不能忽视的[5、6]，因此我们认为如加入一定量的磷酯酶A抗体将会提高此配制的抗毒素的中和效价和实际应用价值。

参 考 文 献

〔1〕 Yang, C.C. et al. Purification of anticobrotoxin antibody by affinity chromatography. *Toxicon*, 1977, 15, 51.

〔2〕 龚潮梁等：一种分离提纯眼镜蛇神经毒素的简便方法，本刊本期83页。

〔3〕 Lee, C.Y. et al.Pharmacological properties of cardiotoxin isolated from Formosan cobra venom. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmak. Exp. Path.*,1968, 259, 360.

〔4〕 Lowry, O.H. et al.Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.

〔5〕 Condrea, E. Membrane-active polypeptides from snake venom Cardiotoxins and haemocytotoxins. *Experientia*, 1974, 30, 121.

〔6〕 Lysz, T.W. and Rosenberg, P. Convulsant activity of *Naja naja* venom and its phospholipase A component. *Toxicon*, 1974, 12, 253.

PURIFICATIONS OF ANTI-COBRA NEUROTOXIN ANTIBODY AND ANTI-COBRA CARDIOTOXIN ANTIBODY BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Sun Xin Gong Chao-liang He Qi-wei Pan Shu-yin

(Kunming Institute of Zoololgy, Academia Sinica)

Abstract

Rabbits hyperimmunized with purified neurotoxin and cardiotoxin from *Naja naja atra* venom in Freund's complete adjuvant produced anti-neurotoxin antisera and anti-cardiotoxin antisera respectively. Cobra neurotoxin and cardiotoxin were immobilized on CNBr-activated Sepharose-4B through their free amino groups without altering their antigenic activities. The antineurotoxin antibody and anticardiotoxin antibody were isolated from rabbit antisera and

horse antisera against cobra venom respectively by affinity chromatography. It showed a single precipitate band on immunodiffusion when both antibodies reacted with neurotoxin and cardiotoxin as well as with cobra venom respectively. Both antibodies were similar elute from Sepharose 4B-neurotoxin and Sepharose 4B-cardiotoxin columns. Specific neutralizing capacities of the purified antineurotoxin antibody and anticardiotoxin antibody increased 17.5 and 35-fold over that of rabbit antisera against cobra neurotoxin and cobra cardiotoxin, and 50 and 33.3-fold over that of horse antisera against cobra venom respectively. It also discussed how to increase efficiency of antisera and how to prepare highly efficient antisera. These results may lead to a substaintial improvement in the therapy of snakebites.